

APPARATUS FOR AMPLIFYING DNA FRAGMENT

Publication number: JP2002306154

Publication date: 2002-10-22

Inventor: HAGIWARA HISASHI; MACHIDA HIROAKI; YOSHIDA
HIDEMI; MIYAZAKI YUSUKE; KODAMA MASAYOSHI

Applicant: HITACHI ELECTR ENG

Classification:
- international: C12M1/00; C12N15/09; C12M1/00; C12N15/09; (IPC1-
7): C12M1/00; C12N15/09

- european:

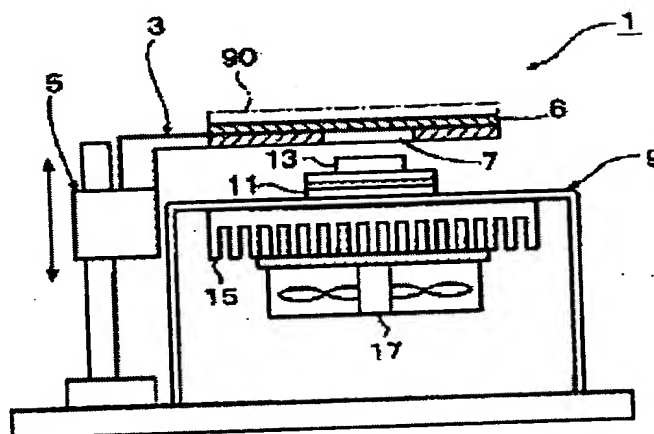
Application number: JP20010117965 20010417

Priority number(s): JP20010117965 20010417

Report a data error here

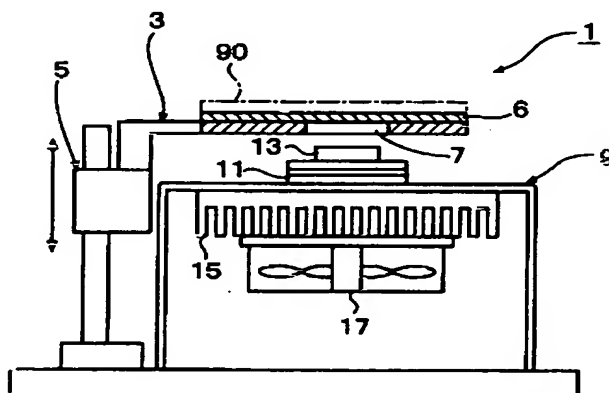
Abstract of JP2002306154

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an apparatus for amplifying DNA fragment capable of carrying out the direct PCR amplification on a fractionated DNA chip without transferring the fractionated DNA fragment to another PCR amplification apparatus. **SOLUTION:** The DNA chip to be used in the present apparatus has a grooved sample fractionating lane having electrode pots at both ends, a grooved sample introducing lane having electrode pots at both ends and crossing the fractionating lane and a grooved sample collecting lane having electrode pots at both ends and branched from the middle part of the fractionating lane at a position separated from the sample introducing lane. The DNA fragment amplifying apparatus is provided with a liftable table for holding the DNA chip, a heating means and a temperature measuring means placed on the table at a position corresponding to the bottom of the pot of the end part of the fractionating lane and a cooling means placed at a position corresponding to the position of the heating means.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(11)特許出願公開番号
特開2002-306154
(P2002-306154A)



【特許請求の範囲】

【請求項1】 両端に電極ポットを有する溝状のサンプル分画レーンと、該分画レーンの途中で、該分画レーンと交差する、両端に電極ポットを有する溝状のサンプル導入レーンと、前記サンプル導入レーンから離れた位置で、該分画レーンの途中で、該分画レーンから分岐され、端部に電極ポットを有する溝状のサンプル分取レーンとを有するDNAチップを載置するための昇降可能な載置台を有し、該載置台の、前記分取レーンの端部のポットの底部に対応する位置に、加熱手段及び温度測定手段を配設し、前記加熱手段が配設された位置に対応する位置に冷却手段を配設したことを特徴とするDNA断片増幅装置。

【請求項2】 前記加熱手段は誘電体基板上に形成された導電体パターンからなり、前記温度測定手段は前記加熱手段と同じ位置に形成された熱電対であることを特徴とする請求項1に記載のDNA断片増幅装置。

【請求項3】 前記加熱手段は誘電体基板上に形成された導電体パターンからなり、前記導電体パターンが前記温度測定手段としても兼用されることを特徴とする請求項1に記載のDNA断片増幅装置。

【請求項4】 前記冷却手段はペルチェ素子であることを特徴とする請求項1に記載のDNA断片増幅装置。

【請求項5】 前記ペルチェ素子は伝熱ブロックと、ヒートシンクと冷却ファンを組み合わせて併用されることを特徴とする請求項4に記載のDNA断片増幅装置。

【請求項6】 前記加熱手段及び温度測定手段は、ガラス及び合成樹脂からなる群から選択される誘電体基板の表面に形成されることを特徴とする請求項2に記載のDNA断片増幅装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はDNAチップと呼ばれるような超小型DNA電気泳動部材に関する。更に詳細には、本発明は目的とするDNA断片を分取し、同時に該断片をその場で増幅することができる超小型DNA電気泳動部材を用いたDNA断片増幅装置に関する。

【0002】

【従来の技術】DNA等の塩基配列を決定する方法として、ゲル電気泳動法が広く実施されている。電気泳動する際に、従来は試料をラジオアイソトープでラベルし、分析していたが、この方法では手間と時間がかかる難点があった。更に、放射能管理の点から常に最大限の安全性と管理が求められ、特別な施設内でなければ分析を行うことができない。このため、最近では、試料を蛍光体でラベルする方式が検討されている。

【0003】光を用いる方法では、蛍光ラベルしたDNA断片をゲル中を泳動させるが、泳動開始部から、15～20cm下方に各泳動路毎に光励起部と光検出器を設けておき、ここを通過するDNA断片を順に計測する。例

えば、配列を決定しようとするDNA鎖を鋳型として酵素反応（ダイデオキシ法）による操作で末端塩基種がわかった種々の長さのDNAを複製し、これらに蛍光体を標識する。つまり、蛍光体で標識されたアデニン（A）断片群、シトシン（C）断片群、グアニン（G）断片群およびチミン（T）断片群を得る。これらの断片群を混合して電気泳動用ゲルの別々の泳動レーン溝に注入し、電圧を印加する。DNAは負の電荷を持つ鎖状の重合体高分子のため、ゲル中を分子量に反比例した速度で移動する。短い（分子量の小さい）DNA鎖ほど早く、長い（分子量の大きい）DNA鎖ほどゆっくりと移動するので、分子量によりDNAを分画できる。

【0004】特開昭63-21556号公報には、レーザで照射される電気泳動装置のゲル上のラインと光ダイオードアレイの配列方向が電気泳動装置内のDNA断片の泳動方向と直角となるように構成されたDNA塩基配列決定装置が開示されている。この装置では、一对のガラス板の間にポリアクリルアミドなどのゲル電解質を充填し、ゲル電気泳動層を形成した後、該ゲル電気泳動層の一端にDNAサンプルを注入し、ゲル電気泳動層の両端をバッファ液に浸漬させながら、その両端に電圧を印加してDNAサンプルを電気泳動させることによりゲル電解質層上にDNA断片を展開する。光を用いる方法では、蛍光ラベルしたDNA断片をゲル中を泳動させるが、泳動開始部から、15～20cm下方に各泳動路毎に光励起部と光検出器を設けておき、ここを通過するDNA断片を順に計測する。例えば、配列を決定しようとするDNA鎖を鋳型として酵素反応（ダイデオキシ法）による操作で末端塩基種がわかった種々の長さのDNAを複製し、これらに蛍光体を標識する。つまり、蛍光体で標識されたアデニン（A）断片群、シトシン（C）断片群、グアニン（G）断片群およびチミン（T）断片群を得る。これらの断片群を混合して電気泳動用ゲルの別々の泳動レーン溝に注入し、電圧を印加する。DNAは負の電荷を持つ鎖状の重合体高分子のため、ゲル中を分子量に反比例した速度で移動する。短い（分子量の小さい）DNA鎖ほど早く、長い（分子量の大きい）DNA鎖ほどゆっくりと移動するので、分子量によりDNAを分画できる。

【0005】しかし、このような装置では一度に多量のサンプルを取り扱うことができるという利点があるものの、泳動作業に数十時間も要し、DNA診断などのような迅速な分析を必要とするような要望には答えることができなかった。

【0006】このような迅速分析という要求に応えるために、DNAチップと呼ばれる超小型DNA電気泳動部材が試作されている（例えば、特開平7-198680号公報及び特開平11-183437号公報参照）。図6はこのようなDNAチップ90の一例の基本パターンを示す平面図である。このようなDNAチップにおける

通常の電気泳動は、チャンネル内をゲルで満たし、ポット94にDNAサンプルを添加し、ポット91はグランドとし、ポット92に荷電を行う（すなわち、ポット92：＋電位、ポット94：－電位）。すると、マイナスに荷電したDNAサンプルはポット94からポット92の方向に移動を始める。DNAサンプルがポット92に到達する十分な時間経過後、ポット93に荷電を切り換える。すると、DNAサンプルは電気泳動路94-92と泳動路91-93の交点にある少量のDNAサンプルがポット93方向へ分離の泳動を始める。“ふるい効果”により分離されたDNA断片は分子量の大きさの小さいものから電気泳動路95-96との交点を通過する。このとき、ポット95に荷電を行い、必要な大きさのDNA断片のみをポット95（すなわち、分取ポット95）に取り込む。分取ポット95に取り込まれたDNA断片はその後、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応法）による増幅及び塩基配列解析などの継続処理に使用される。

【0007】PCR法の原理は、例えば、実験医学、V o 1. 7, No. 2, 14頁～18頁（1989）に詳細に説明されている。このPCR法は基本的に、①特定のDNA領域を挟んだ2種類のプライマーが結合された2本鎖DNAを熱変性により1本鎖に変性し、②プライマーをアニーリングし、③Taqポリメラーゼにより伸長させることからなる一連のサイクルからなり、このサイクルを数十回繰り返すことにより、その特定DNA領域を数十万倍に増幅させることからなる。

【0008】従来のPCR自動増幅装置では、ポリメラーゼ連鎖反応をプラスチック製のエッペンドルフチューブのような小型試験管内で行っていた。このため、従来の装置では、エッペンドルフチューブを温度調節可能なチャンバ内に収容し、このチャンバ内の温度を変化させることにより、エッペンドルフチューブ内の反応混合物の温度を、①熱変性、②アニーリング③伸長にそれぞれ必要な温度に周期的に変化させる。例えば、①熱変性の場合には約94℃、②アニーリングの場合には約55℃、③伸長の場合には約72℃にされる。

【0009】しかし、従来のPCR自動増幅装置の場合、DNA断片の増幅に2時間、DNA断片の塩基配列解析に1時間、合計3時間を要していた。このため、従来の装置では、感染症の診断や食中毒の診断など、原因を突き止めるための作業に時間が掛かりすぎ、発症から手当てまでの間に長時間経過してしまい、存命率の低迷が問題となっていた。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、分取したDNA断片を別のPCR増幅装置に移すことなく、分取したDNAチップ上で直接PCR増幅することができるDNA断片増幅装置を提供することである。

【0011】

【課題を解決するための手段】前記課題は、両端に電極ポットを有する溝状のサンプル分画レーンと、該分画レーンの途中で、該分画レーンと交差する、両端に電極ポットを有する溝状のサンプル導入レーンと、前記サンプル導入レーンから離れた位置で、該分画レーンの途中で、該分画レーンから分岐され、端部に電極ポットを有する溝状のサンプル分取レーンとを有するDNAチップを載置するための昇降可能な載置台を有し、該載置台の、前記分取レーンの端部のポットの底部に対応する位置に、加熱手段及び温度測定手段を配設し、前記加熱手段が配設された位置に対応する位置に冷却手段を配設することにより解決される。

【0012】前記加熱手段は導電性金属のパターンからなり、前記温度測定手段は前記加熱手段の導電性金属パターン内に設けられた熱電対パターンであるか、又は前記加熱手段用の導電性金属パターンを温度測定手段として兼用することができる。また、前記冷却手段はペルチェ素子からなることが好ましい。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、図面を参照しながら本発明の実施の形態について詳細に説明する。図1は本発明によるDNA断片増幅装置1の概要断面図である。図1において、DNA断片増幅装置1はDNAチップ載置台3を有する。DNAチップ載置台3は適当な昇降機構5に支持されている。DNAチップ載置台3の上面には加熱手段6が配設されている。DNAチップ載置台3の一部には貫通孔7が設けられている。DNAチップ載置台3の下側には、冷却手段9が配設されている。冷却手段9は例えば、ペルチェ素子11などである。ペルチェ素子11は例えば、伝熱ブロック（例えば、アルミブロック）13と組み合わせて使用することが好ましい。また、放熱などの効率を高めるために、ペルチェ素子11の他方の側にヒートシンク15を接続させることが好ましい。更に、ヒートシンク15の効率を高めるために冷却ファン17を併用することが好ましい。言うまでもなく、ペルチェ素子以外の冷却手段も使用できる。昇降機構5を駆動させてDNAチップ載置台3を下降させると、DNAチップ載置台3の貫通孔7内に伝熱ブロック13が進入し、ブロック13の上面を加熱手段6の下面に接触させることができる。昇降機構5は例えば、ステッピングモータ、ボールスクリュウ、ACモータなど任意の精密制御可能な駆動手段を使用することができる。

【0014】図2は図1に示された加熱手段6の上面図である。加熱手段6は、ガラス（例えばバイレックス（登録商標）ガラス）又は合成樹脂（例えば、アクリル樹脂）などのような誘電体の表面にパターン形成された発熱部18と温度測定部19とを有する。発熱部18の両端には接続端子21が配設されている。また、温度測定部19の両端には接続端子23が配設されている。発

熱部18及び温度測定部19のパターン厚は例えば、 $0.5\mu\text{m}$ 程度である。発熱部18及び温度測定部19の上面には例えば、テフロン（登録商標）コーティング（図示されていない）などを施すこともできる。

【0015】図3は図2に示された加熱手段6のA部の拡大図である。発熱部18は例えば、白金（Pt）又はクロム（Cr）などの導電性金属からなるパターンである。線幅は例えば、 0.3mm 程度である。発熱部18は例えば、 $10\text{mm}\times 10\text{mm}$ 程度の面積を有する。温度測定部19は例えば、線幅が 0.2mm 程度の銅パターン25と、線幅が 0.2mm 程度のコンスタンタンパターン27とで構成される熱伝対であることができる。銅パターン25とコンスタンタンパターン27とは中央で接続されている。銅及びコンスタンタン以外の、例えば、クロメル・アルメル等のパターン化可能な金属類からなる熱電対も使用できる。

【0016】図4は図1に示された加熱手段6の別の実施例の上面図である。この場合、加熱手段は、ガラスなどの誘電体基板の表面に形成された発熱部40と、この発熱部40と電源（図示されていない）とを接続するための端子42、42とから構成されている。発熱部40に用いる導電性金属は白金又はクロムなどの測温抵抗体を用いている。これらの測温抵抗体は温度に比例して抵抗値が変化し、温度センサーなどに用いられている材料である。従って、この実施例では、発熱部40を構成する導電性金属パターンは、温度測定端子44、44にも接続されている。発熱部40を構成する導電性金属パターンの端子42、42を加熱用電源（図示されていない）に接続して加熱し、温度測定端子44、44の抵抗値を適当な温度測定器（図示されていない）でモニターすることにより1種類の導電性金属パターンのみで、加熱と温度測定の両方の機能を達成させることができる。

【0017】図5は本発明のDNA断片増幅装置1の動作を制御するための制御系の概要構成図である。加熱手段6の温度測定部19はコントローラ30に接続されている。コントローラ30は例えば、MPU32とメモリ34を有する。メモリ34には本発明のDNA断片増幅装置1の加熱、冷却、昇降などの各動作に関する制御プログラムが格納されている。コントローラ30は電源回路36に接続されており、この電源回路36は加熱手段6の発熱部18、ペルチェ素子11、冷却ファン17及び昇降機構5のモータに接続されている。

【0018】次に、本発明のDNA断片増幅装置1の動作について説明する。まず、DNAチップ90を加熱手段6の上面に載置する。この場合、DNAチップ90の分取ポット95が加熱手段6の上面に位置するように、DNAチップ90を加熱手段6の上面に位置決めして配置する事が好ましい。この際、昇降機構5を駆動させて、DNAチップ載置台3を上昇させて、冷却手段9から離しておく。DNAチップ90を加熱手段6の上面に

載置したら、発熱部18の端子21を介して電流を白金パターンに流して発熱させる。同時に、温度測定部19で温度測定を開始する。PCR増幅に必要な温度に達したら、その温度を維持するように、発熱部18をON/OFFさせる。PCR増幅に必要な温度を所定時間維持したら、昇降機構5を駆動させて、DNAチップ載置台3を下降させ、加熱手段6の発熱部18の下面に冷却手段9の伝熱ブロック13を接触させ、ペルチェ素子11を駆動させ、更に必要に応じて冷却ファン17を駆動させて冷却する。この時の冷却温度も温度測定部19で測定できる。その後、再度加熱する場合、ペルチェ素子11及び冷却ファン17を停止させる。そして、昇降機構5を駆動し、DNAチップ載置台3を上昇させて伝熱ブロック13と加熱手段6とを離し、発熱部18に通電して加熱を再開し、温度測定部19で温度測定を行う。前記のように、PCR増幅を行う場合、①熱変性の場合には約 94°C 、②アニーリングの場合には約 55°C 、③伸長の場合には約 72°C の温度に加熱する。ペルチェ素子11は冷却だけでなく、加熱目的にも使用できる。

【0019】PCR増幅に必要なTaqポリメラーゼなどの酵素類およびその他必要な試薬類は予め分取ポット95内に添加しておくことができる。または、図示されていない他の自動供給装置を併用するか、又は手作業でDNAチップの分取ポット95に事後的に供給することもできる。

【0020】

【発明の効果】以上説明したように、本発明の装置によれば、DNAチップの分取ポットに分取された所望のDNA断片を、DNAチップ上でその場でPCR増幅することができる。その結果、従来のPCR増幅装置では増幅に2時間以上要していたが、本発明の装置によれば約30分間程度で本検査が可能となる。従って、感染症の診断や、食中毒の診断など非常に迅速に実施することができ、発症から手当までの時間が短縮され、存命率を高めることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のDNA断片増幅装置の概要構成図である。

【図2】図1に示されたDNA断片増幅装置における加熱手段の上面図である。

【図3】図2に示された加熱手段のA部の部分拡大図である。

【図4】図1に示されたDNA断片増幅装置における加熱手段の別の実施例の上面図である。

【図5】本発明のDNA断片増幅装置の制御系を示す概要ブロック図である。

【図6】DNAチップ90の一例の基本パターンを示す平面図である。

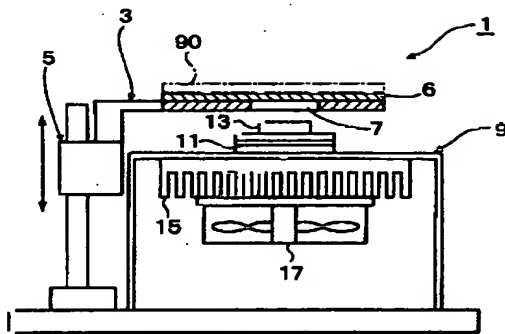
【符号の説明】

1 本発明のDNA断片増幅装置

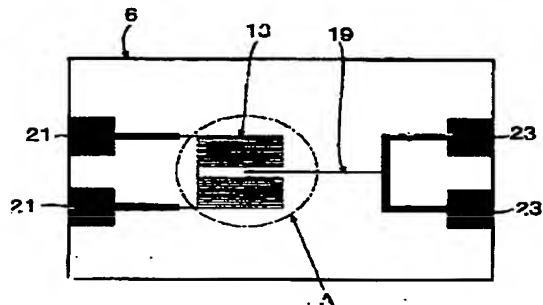
- 3 DNAチップ載置台
- 5 昇降機構
- 6 加熱手段
- 7 貫通孔
- 9 冷却手段
- 11 ペルチェ素子
- 13 伝熱ブロック
- 15 ヒートシンク
- 17 冷却ファン
- 18 発熱部
- 19 温度測定部

- 21, 23 接続端子
- 25 銅パターン
- 27 コンスタンタンパターン
- 30 コントローラ
- 32 MPU
- 34 メモリ
- 36 電源回路
- 40 発熱部
- 42, 44 接続端子
- 90 DNAチップ
- 95 分取ボット

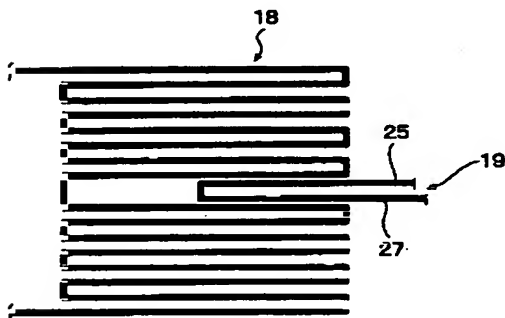
【図1】



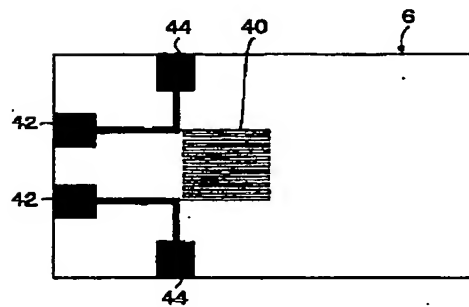
【図2】



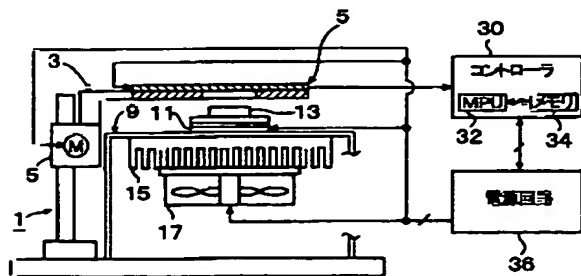
【図3】



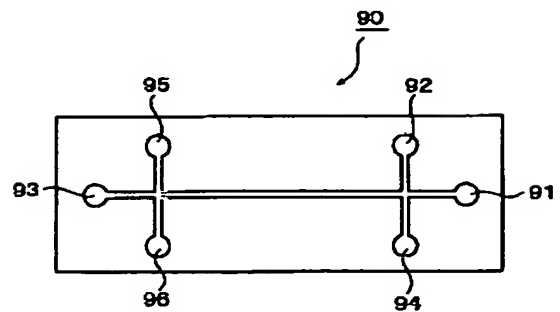
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 吉田 秀美
東京都渋谷区東3丁目16番3号 日立電子
エンジニアリング株式会社内
(72)発明者 宮崎 祐輔
東京都渋谷区東3丁目16番3号 日立電子
エンジニアリング株式会社内

(72)発明者 児玉 正吉
東京都渋谷区東3丁目16番3号 日立電子
エンジニアリング株式会社内
Fターム(参考) 4B024 AA20 CA01 CA11 HA14 HA19
4B029 AA23 BB20 CC02